

Open Research Online

The Open University's repository of research publications and other research outputs

UVA Assisted 4-Thiothymidine for Cancer Treatment

Journal Item

How to cite:

Ge, Jiang; Feng, Luo; Yaozhong, Xu and Xiaohui, Zhang (2016). UVA Assisted 4-Thiothymidine for Cancer Treatment. Progress in Chemistry, 28(8) pp. 1224–1237.

For guidance on citations see [FAQs](#).

© 2016 Editorial Board of Progress in Chemistry



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Version: Version of Record

Link(s) to article on publisher's website:

<http://dx.doi.org/doi:10.7536/PC151137>

<http://www.progchem.ac.cn/EN/10.7536/PC151137>

Copyright and Moral Rights for the articles on this site are retained by the individual authors and/or other copyright owners. For more information on Open Research Online's data [policy](#) on reuse of materials please consult the policies page.

oro.open.ac.uk

近紫外光辅助 4-硫脱氧胸苷抗癌作用的研究*

蒋 革¹ 罗 锋¹ 徐耀忠² 张晓辉^{3**}

(1. 大连大学生命科学与技术学院 大连 116622; 2. Department of Life, Health and Chemical Sciences, The Open University, Milton Keynes, MK7 6AA, UK; 3. 大连大学环境与化学工程学院 大连 116622)

摘 要 4-硫脱氧胸苷(4-thiothymidine, S⁴TdR)作为硫代类核苷类似物的典型代表,其具有较强的亲脂特性和强的紫外长波长(315 ~ 400 nm, UVA)吸收。这些特性使得 4-硫脱氧胸苷能够靶向进入肿瘤细胞并以核苷酸的形式嵌入 DNA 链中,在近紫外 UVA 的辅助下发生光化学反应,损伤肿瘤细胞 DNA,诱导细胞走向凋亡途径,达到抗癌的目的。本文系统地介绍和评述了长波紫外光/含硫脱氧胸苷(UVA/thiothymidine)的抗癌疗法及原理,探讨 4-硫脱氧胸苷与人血清蛋白间的相互作用,为这种新型光化学疗法在今后的癌症治疗中提供基础的理论依据。

关键词 4-硫脱氧胸苷 光化学反应 细胞凋亡 抗癌药物

中图分类号:O629. 74;O625. 7;Q751 文献标识码:A 文章编号:1005-281X(2016)08-1224-14

UVA Assisted 4-Thiothymidine for Cancer Treatment*

Jiang Ge¹ Luo Feng¹ Xu Yaozhong² Zhang Xiaohui^{3**}

(1. School of Life Science and Biotechnology, Dalian University, Dalian 116622, China; 2. Department of Life, Health and Chemical Sciences, The Open University, Milton Keynes, MK7 6AA, UK; 3. College of Environment and Chemical Engineering, Dalian University, Dalian 116622, China)

Abstract This article reviews the developments of 4-thiothymidine analogues, assisted with UVA light, as a novel cancer therapy. First, the key points on synthetic chemistry, photochemistry and cellular toxicity of 4-thiothymidine are summarized. As the chemical structure of 4-thiothymidine is very similar to that of its parent thymidine, thus 4-thiothymidine can be readily incorporated into cellular DNA, and with the help of thymidine kinase, much more preferably into cancerous DNA. Unlike thymidine, 4-thiothymidine can absorb strongly in UVA (longer wavelengths of UV) light. Thus UVA-assisted 4-thiothymidine offers an effective cancer treatment. Some underlying mechanisms of action by 4-thiothymidine/UVA and compares this cancer approach with the commonly used photodynamic therapy are discussed. The various interactions between 4-thiothymidine with human serum albumin are introduced. Finally, a short conclusion on the past efforts and a brief prospect for future work in this exciting research field are given.

Key words 4-thiothymidine; photochemical reaction; cell apoptosis; anti-cancer drugs

收稿: 2015 年 11 月, 收修改稿: 2016 年 5 月, 网络出版: 2016 年 8 月 25 日

* 教育部留学回国人员科研启动基金

The work was supported by the Research and Start Fund of the Ministry of Education.

** Corresponding author e-mail: xiaohui99@hotmail. co. uk

Contents

- 1 Introduction
- 2 Key properties of 4-thiothymidine
- 3 Synthetic chemistry and photochemistry of 4-thiothymidine
 - 3.1 Synthetic chemistry of 4-thiothymidine
 - 3.2 Photochemistry of 4-thiothymidine under UVA irradiation
- 4 Antitumor activity of 4-thiothymidine under UVA irradiation
 - 4.1 Cytotoxicity of 4-thiothymidine
 - 4.2 Synergistic toxicity of 4-thiothymidine with UVA irradiation
 - 4.3 UVA assisted 4-thiothymidine for cancer treatment
 - 4.4 UVA assisted 4-thiothymidine versus photodynamic therapy
- 5 Antitumor mechanisms of UVA assisted 4-thiothymidine
 - 5.1 Cellular incorporation of 4-thiothymidine
 - 5.2 Principles of tumor-killing via UVA assisted 4-thiothymidine
 - 5.3 Induced apoptosis via UVA assisted 4-thiothymidine
 - 5.4 4-Thiothymidine metabolism
- 6 4-Thiothymidine stability in blood circulation
 - 6.1 Spectrometry
 - 6.2 Atomic force microscope
 - 6.3 Molecular docking
- 7 Conclusion

1 引言

核酸(DNA 和 RNA)在生命活动中起着根本性的作用,因此核苷类似物及其衍生物,由于其结构与核酸的组成相似,在新型抗癌药的研究中表现出显著优越性^[1]。尤其碱基的结构对核苷类似物的生物活性更是起着决定性的作用,通过对嘌呤、嘧啶的修饰物所得到的核苷酸类似物,能够以伪代谢物的形式掺入繁殖旺盛的细胞(例如肿瘤细胞)的 DNA 中,从而干扰其 DNA 合成并抑制肿瘤细胞生理代谢所必需的代谢途径,导致肿瘤细胞死亡。因此对天然碱基的基团进行改造(即核苷的改性工作),已越来越引起人们的关注。通过对核苷碱基进行结构修饰,还可以合成出新化合物^[2]。改性后的核苷类似物在化学、生命科学及医学等领域具有重要的意义和现实的价值^[3,4]。

天然脱氧核糖核酸(DNA)不包含硫,自从 Lipsett^[5] 从大肠杆菌分离出 4-硫尿嘧啶核苷酸之后,含硫碱基和硫代核苷吸引了人们的关注。与正常 DNA 相比,含硫碱基 DNA 具有独特的化学和生物学性质^[6~11],例如含有巯基的嘧啶环系列化合物具有抗癌活性和免疫增强作用^[12],这是因为与传统的嘧啶碱基相比,硫代嘧啶碱基在亲脂性有一定的增强^[13]。4-硫尿苷(4-thiouridine)在结构上与尿苷(uridine)类似,研究表明它能抑制转移核糖核酸(tRNA)的合成^[14],因此对 tRNA 的生命活动有重要作用^[15]。其次,4-硫尿苷在光学性质表现独特,紫外吸收最大波长在 330 nm 处,所以对近紫外光敏感,可作为标记 RNA 的紫外探针^[16]和共振拉曼探针^[17]。4-硫代核苷的优势渐渐凸显,此类化合物的研究也备受重视。研究发现:胸苷的 4 位氧原子被硫原子取代后,嘧啶环上的共轭效应增强;硫原子上的电子跃迁能级差减小,其紫外吸收波长发生红移,由 260 nm 红移至 336 nm^[18],这类含有巯基的核苷类化合物表现出对长波的紫外光(即近紫外光)极其敏感,易在近紫外光的辐射下发生光化学反应。基于含硫核苷类化合物的光敏性和对肿瘤细胞有特殊的亲合力以及核苷类化合物的抗肿瘤及抗癌活性,2001 年 Karran 和徐耀忠提出了一种新颖的肿瘤靶向治疗法——近紫外光/4-硫脱氧胸苷(UVA/thiothymidine)治疗法^[19, 20],即利用近紫外光(UVA)与 4-硫脱氧胸苷(4-thiothymidine, S⁴TdR)协同作用来损伤癌变的 DNA 及其杀死癌细胞。研究表明:4-硫脱氧胸苷能够选择性地靶向癌变的细胞和组织并以核苷酸的形式嵌入到靶细胞的 DNA 中,使其对近紫外光(UVA)更加敏感;在近紫外光的作用下杀死癌细胞。因此开发和研究 4-硫脱氧胸苷可以为新型核苷类抗癌药物的设计、合成与开发、靶点药物的筛选和利用以及药物的现代化生产等提供了一些理论和实验基础。

本文结合国内外 4-硫脱氧胸苷和近紫外光辅助 4-硫脱氧胸苷来损伤癌变的 DNA 及其杀死癌细胞的研究进展,着重介绍近期 4-硫脱氧胸苷的化学合成、其光化学的研究结果、近紫外光辅助 4-硫脱氧胸苷治疗方法、抗肿瘤机制及其与人血清白蛋白相互作用研究发展和本研究组的相关研究工作。

4-硫脱氧胸苷(如图 1 所示)是一种含硫嘧啶脱

2 4-硫脱氧胸苷简介

氧核糖核苷类化合物,结构与胸腺嘧啶脱氧核糖核苷(简称胸苷,thymidine)类似,但是它们的紫外吸收谱图却有着很大的差别,胸苷的最大紫外吸收波长在 270 nm,而 4-硫胸苷的最大紫外吸收波长延伸在 340 nm 的近紫外波段(图 1 所示),这就决定了 4-硫脱氧胸苷可在较低的能量激发下,进入激发态。胸苷的 4 位氧原子被硫原子取代后,硫原子的 3p 电子受原子核的束缚比氧原子的 2p 电子小,离域后与大环上的电子共轭,使共轭效应增强;硫原子上的电子可通过 3p→3d 跃迁,硫原子 3p 轨道的电子比氧原子中 2p 轨道的电子的能级高,而硫原子的 3d 轨道能级比羰基 C=O 的 $2\pi^*$ 轨道提高不多,故硫羰基 C=S 的 3p→3d 跃迁所需能量小,有利于 3p 电子的激发,这才使得胸苷 4-位氧原子被硫原子取代后其紫外吸收波长移向长波方向,由 260 nm 红移至 336 nm^[18]。

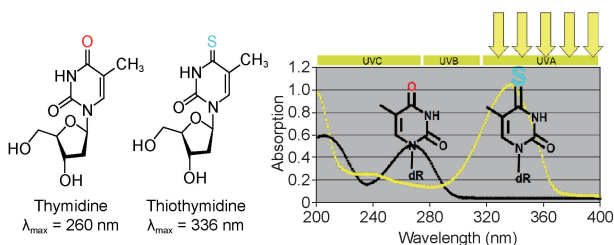


图 1 天然的胸苷 (TdR, 左) 和 4-硫脱氧胸苷 (S^4 TdR, 右) 的化学结构及它们的紫外吸收光谱^[18]

Fig. 1 Chemical structures of thymidine (TdR, left) and 4-thiothymidine (S^4 TdR, right) and their absorption spectra^[18]

任何化合物都能吸收光,但其所吸收特定波长的光取决于该化合物的化学结构。作为生命物质的蛋白质和核酸(例如 DNA)的光吸收波长分别在 280 和 260 nm 的远紫外光(或称中波,短波紫外光,UVB 和 UVC)区域(如图 2 所示)。由于大气层的臭氧和尘粒将短波长高能量的 X-射线和大部分的紫外光已过滤掉了,至使人类和其他生物仍能用蛋白质和核酸作为最根本的生命物质。而含有硫羰基的核苷类化合物,其对长波长的近紫外光(UVA)极其敏感。这种改变在生物学领域有着不可估量的功效。因此近紫外光可用于选择性地损坏含有硫代碱基的 DNA,对正常的 DNA 没有影响。最近研究表明 4-硫脱氧胸苷是一种潜在的抗癌药物,尤其是在近紫外光辅助下可以治疗膀胱癌和皮肤癌^[21,22]。

	(UV)				visible light
	UVC	UVB	UVA		
wavelength	260	280	320	400	
chemical substance	DNA		sulfur-containing DNA		
compound	protein				colored complexes

图 2 化合物的光吸收区间

Fig. 2 Optical absorption range for various compounds

3 4-硫脱氧胸苷的合成化学和光化学研究

3.1 4-硫脱氧胸苷的合成化学研究

含硫碱基 DNA 的常用制备方法第一步就是获得必需的含硫核苷(如受保护的含硫碱基核苷)。虽然一些含硫碱基(如 4-硫尿嘧啶)的核苷可以买到,但是大多数含硫碱基脱氧核糖核苷仍未上市,因此,必须制备所需要的含硫核苷。本文中含硫核苷指的是除了其他必须基团外还带有含硫碱基的脱氧核糖核苷。

已有三种有效的方法将胸苷类似物转变成 4-硫脱氧胸苷类似物:五硫化二磷法、Lawesson's 试剂法和三唑法。这些方法被广泛用于制备修饰核苷。4-硫脱氧胸苷和 4-硫脱氧尿苷可以通过用保护的嘧啶核苷(糖基)与五硫化二磷(P_2S_5)或者 Lawesson's 试剂^[23]来制备,如图 3 所示。Lawesson's 试剂路线更适用于对酸稳定和对温度不敏感的核苷合成。但是有些 4-硫脱氧胸苷的类似物,如 4-硫-5-溴-2'-脱氧尿苷(4-thio-5-bromo-2'-deoxyuridine)和 4-硫-5-碘-2'-脱氧尿苷(4-thio-5-iodo-2'-deoxyuridine)的合成受温度影响较大,因此,有必要设计一条新的合成方案^[24],即在定量产率下通过对嘧啶核苷的类似物的 4 取代位上的氧转变成一种三唑的衍生物,接着,合成的混合物需要用硫代乙酸处理,使其获得所需要的硫代核苷。该反应主要的优点是在 DNA 的合成都在室温下进行,并且也同样适用于对温度敏感的化合物以及携带在 5 位上有保护基团的 DMT 基团的核苷,这种 DMT 基团对酸极不稳定。4-硫脱氧胸苷的类似物(5-溴-2'-脱氧尿苷和 5-碘-2'-脱氧尿苷)也可以用同样的方法来合成,尽管产率有些不同^[25,26]。这三种方法也可将其他 5-取代的胸苷类似物转为 5-取代-4-硫脱氧胸苷类似物。

3.2 4-硫脱氧胸苷和近紫外光作用的光化学研究

来自有缺陷着色性干皮病(xeroderma pigmentosum, XP)患者核苷酸切除修复(nucleotide

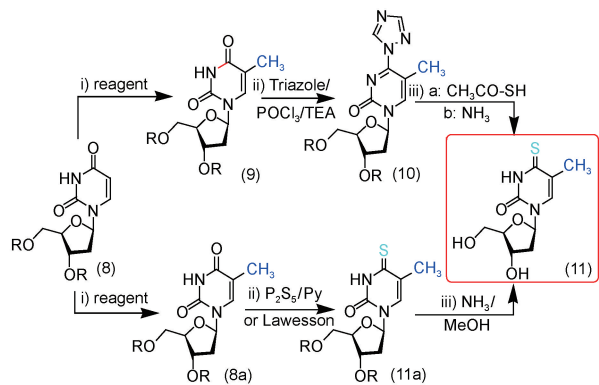


图 3 4-硫脱氧胸苷类似物的合成方法^[23]

Fig. 3 Synthetic route to 4-thionucleosides^[23]

excision repair, NER) 的细胞对中波紫外线 (UVB) 和短波紫外线 (UVC) 是很敏感的, 这都会引起邻近 DNA 嘧啶的交联, 可以形成 (6-4) 嘧啶-嘧啶酮 [(6-4) PP] 加合物和环丁烷嘧啶二聚体 (CPD)。这些细胞一般对单独高剂量的长波紫外线 (UVA) 稍微敏感, 很有可能是因为在这些波长下生成了一些环丁烷嘧啶二聚体 (CPD)^[28,29]。Massy 等^[19] 指出, 着色性干皮病 (XP) 互补群 A (XPA) 纤维细胞比一种特点较差的 XPA 回复突变细胞系 NER-proficient MRC5VA 细胞对 S⁴TdR/UVA 敏感约 30 倍。细胞在 UVC 的辐射下能够对因 UVC 感应而生成的环丁烷嘧啶二聚体 (CPD) 表现出很强的切除能力, 可以通过 (6-4) 嘧啶-嘧啶酮的形成确定对 UVC 的敏感程度, 但是环丁烷嘧啶二聚体 (CPD)^[30] 的形成并不是 S⁴TdR/UVA 高灵敏度的主要表现^[19]。这些结果表明: 类似 (6-4) 嘧啶-嘧啶酮的和被核苷酸切除修复的链内 DNA 病变是 S⁴TdR/UVA 引起细胞死亡的重大贡献者。早期的化学研究与这种可能性相一致, 研究显示, 长波紫外线 (UVA) 照射含有 3 位用 T 取代的寡聚脱氧核苷酸产生一种环硫烷光产物, 它与中波紫外线 (UVB) 型 (6-4) 嘧啶-嘧啶酮加合物很相似。然而, 它们的光产物有显著的不同 (图 4)^[31,32], 分别用短波紫外线 (UVC) 和长波紫外线 (UVA) 照射 TpT 或 Tp⁴S⁴T 产生杂氧环丁烷或环硫烷分子。然而杂氧环丁烷非常不稳定并自发的转化成它的开环形式, 环硫烷相对稳定并与开环形式保持 3:1 比例的平衡。用 300 nm 的紫外光照射 (6-4) T: T 和 S⁵-(6-4) T: T 把他们转化成各自的 Dewar 异构体。闭环环硫烷和它的同分异构体开环环硫烷之间的平衡有利于闭环结构^[33~35], 而它的含氧杂环丁烷同系物绝大多数是形成一个闭环结构。

环硫烷表现出荧光性, 并且荧光产物是一种可化学进展, 2016, 28(8): 1224 ~ 1237

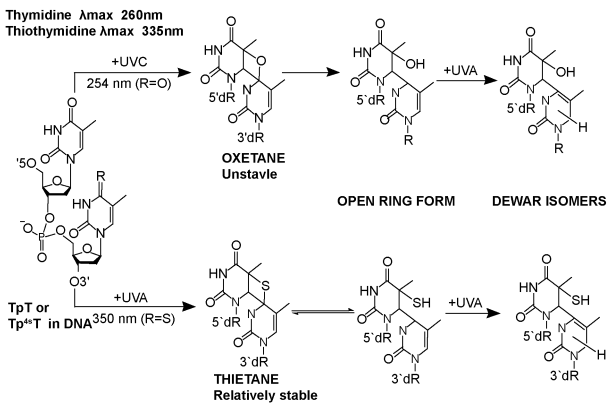


图 4 紫外线照射后, TpT 或者 Tp4ST 二聚体的光化学反应^[31,32]

Fig. 4 Photochemistry of TpT or Tp4ST dimers upon UV irradiation^[31,32]

预测性质的 S⁵-(6-4) T: T, 这在最近用 S⁴TdR/UVA 治疗人类细胞的 DNA 中得到证实^[37]。人体皮肤胶质细胞系 (HaCaT) 能有效地切除这种荧光产物。然而, 它的化学结构比典型的 (6-4) 嘧啶-嘧啶酮的开环结构稳定。S⁵-(6-4) T: T 加合物的除去在人体 CCRF-CEM 白血病细胞中除去更慢, 大多数在白血病细胞能存在长达 24 h。(6-4) 嘧啶-嘧啶酮病变的快速修复反映了其引发了显著的 DNA 畸变。我们假设, 相对持久的 S⁵-(6-4) T: T 反映了不太明显的 DNA 畸变, 可能是由于在结构中形成的闭环结构。

开环氧杂环丁烷和环硫烷形式都能在接下来进一步的长波紫外线 (UVA) 照射下轻易地转变成其光学异构体形式。日光的长波紫外线范围是引起典型 (6-4) 嘧啶-嘧啶酮细胞的光异构化^[38]。有趣的是, 典型的 (6-4) 嘧啶-嘧啶酮光学异构体形式在不同细胞或物种间不以相同的速度进行修复。与 (6-4) 嘧啶-嘧啶酮修复相比, 在仓鼠卵巢细胞中, (6-4) 嘧啶-嘧啶酮光学异构体速度慢且与环丁烷嘧啶二聚体 (CPD) 的修复相近, 而在人类的纤维细胞^[39] 和胶质细胞^[40] 中修复稍微快些。细胞中与环硫烷相关的 (6-4) 嘧啶-嘧啶酮光学异构体的光产物的 DNA 的命运仍不确定。

有缺陷的核苷酸切除修复 (NER) 细胞和在同源重组 (HR) 或链内交联 (ICL)^[36] 中有缺陷的细胞的极端敏感表明, 4-硫脱氧胸苷/近紫外线 (S⁴TdR/UVA) 的细胞毒性依赖于它在 UVA 辐射下对 DNA 结构的诱导病变的能力, 这些病变对 DNA 复制是很严重的阻碍。我们确定了两种可能的 DNA 病变: 链内交联 (ICL) 和 S⁵-(6-4) T: T 加合物, 但是额外的潜

在细胞毒性 DNA 病变并没有被排除在外。DNA 蛋白质的交联在长波紫外线照射来自 4-硫脱氧胸苷/近紫外线治疗的膀胱癌细胞的含有 4-硫脱氧胸苷 (S^4TdR) 的寡聚脱氧核苷酸和 DNA 下形成^[40~42]。虽然对 DNA 交联修复机制并不十分清楚,但是有人认为对于较小的交联结构可直接切除,这种直接切除机制部分依靠核苷酸切除修复^[43,44]。同时,在对人体皮肤胶质细胞系 (HaCaT)^[36] 的 4-硫脱氧胸苷/近紫外线治疗中产生双链断裂 (DSB) 现象,即含 4-硫脱氧胸苷的 DNA 在近紫外线的辐射下表现出较强的光活化作用能够阻止 DNA 复制。值得注意的是,其他含有硫基光化学产物的 DNA 复制的阻止也有报道^[45]。尽管是一种近紫外线光敏剂,即使在超致死和细胞存活率小于 1% 的条件下^[36],含 4-硫脱氧胸苷的 DNA 并没有在可检测范围内增加 DNA 的单链断裂、氧化的鸟嘌呤和人体皮肤胶质细胞系 (HaCaT) 中的环丁烷嘧啶二聚体 (CPD) 的产量。为了更好的理解 4-硫脱氧胸苷/近紫外线调节毒性机理和它可能的碱基配对,在以后的研究中需要对含 4-硫脱氧胸苷的 DNA 光化学产物进行直接的化学表征和定量分析。

4 近紫外光照射下的 4-硫脱氧胸苷抗肿瘤活性研究

4.1 4-硫脱氧胸苷的细胞毒性

4-硫脱氧胸苷作为核苷的修饰物,与另外一种硫代嘌呤类似物,6-硫代嘌呤 (6-thioguanine, 6-TG)^[46~51] 相比,表现出极低的细胞毒性,不会引起细胞的直接死亡^[19,36]。在 Raji 细胞增殖实验中 (如图 5 所示),通过血细胞计数法对分别用不同药物处理的 Raji 细胞进行增殖计数发现: S^4TdR (4-硫脱氧胸苷) 的单独作用于其他各组相比,对细胞是无毒性的;研究者即使将 S^4TdR 浓度增加到 300 μM 时,至少在两个细胞生长周期内,没有检测到显著的细胞毒性^[19,36,52]。同时,作为一种外界刺激物,往往会对作用细胞产生一定的诱变作用,4-硫脱氧胸苷已被证实其诱变作用极低,体外仓鼠 CHO-D422 细胞刺激实验发现,其对腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (APRT) 基因突变的频率仅仅增加了 1.5 倍^[19]。以上实验结果均表明:4-硫脱氧胸苷是一种低毒、低诱变的硫代胸苷类似物能够嵌入到细胞的 DNA 参与正常的基因配对,完成编码过程。

4.2 近紫外光辅助 4-硫脱氧胸苷的协同毒性

前面提到过,4-硫脱氧胸苷单独对细胞的作用

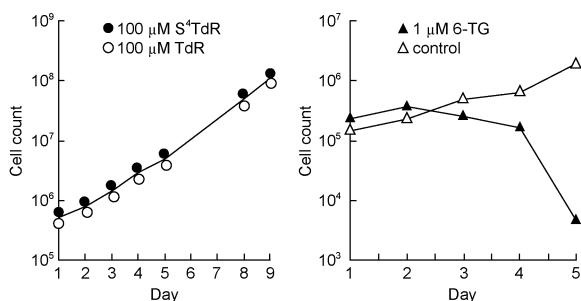


图 5 4-硫脱氧胸苷对细胞的无毒性作用^[19]

Fig. 5 The non-toxic of S^4TdR for growing cells^[19]

不会引起细胞死亡,但在近紫外光 (UVA) 的辅助照射下 (图 6) 却可以引起细胞的显著性死亡^[19]。在 4-硫脱氧胸苷 (S^4TdR) 处理后的 Raji 细胞后接受 UVA 辐射实验中,未接受 UVA 处理的空白组,细胞数量显著递增;受到 UVA 照射的细胞数量在随后的四天里细胞数量明显呈下降趋势;第 5 天起,细胞数量又呈递增趋势 (图 6)。而作为光刺激的 UVA 剂量单独作用时不足以引起细胞的显著死亡^[19,36,53],说明:4-硫脱氧胸苷与 UVA 的联合作用能够有效杀死癌细胞,而且其作用远远强于 4-硫脱氧胸苷或 UVA 的单独作用。

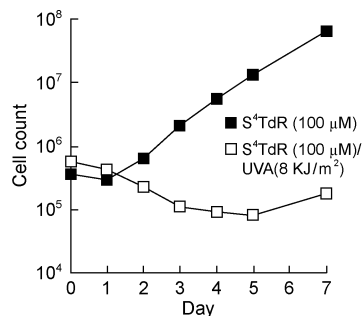


图 6 近紫外光/4-硫脱氧胸苷对淋巴瘤细胞的毒性^[19]

Fig. 6 The toxicity of S^4TdR /UVA for Raji Burkitt's lymphoma cell^[19]

4-硫脱氧胸苷作为化学修饰后的胸苷类似物,其最大的吸收波长提升到 340 nm,不仅是 UVA 的光敏剂,能在 UVA 的照射下表现出较强的细胞毒性,这种对细胞的杀伤作用的强度具有剂量依赖性 (如图 7 所示),4-硫脱氧胸苷致敏程度越高,UVA 剂量越大产生的细胞毒性就越强。除此之外,4-硫脱氧胸苷也能降低细胞对 UVA 的光敏系数。MRC5VA 人类成纤维细胞在获得最大的 4-硫脱氧胸苷替代后,能够使其对 UVA 的 D_{37} 值 (单个细胞致死必须剂量) 减少 100 多倍,光敏系数值也从 70 KJ/m^2 减少到 0.5 KJ/m^2 ^[19]。UVA 的剂量和 4-硫

脱氧胸苷的致敏程度决定杀死细胞的程度(如图 7 所示),4-硫脱氧胸苷的作用剂量越大,UVA 光照强度越高,其对肿瘤细胞的杀伤作用就越强^[36]。这表明:4-硫脱氧胸苷作为一种光敏药物,只有与 UVA 的联合作用才能表现出较高的细胞毒性从而达到杀死细胞的目的。

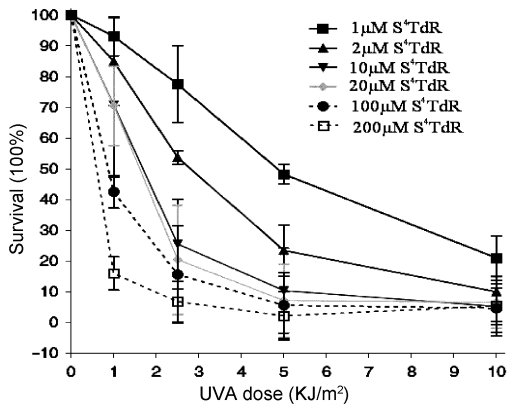


图 7 MY-3L 膀胱癌细胞对低剂量 UVA 的致敏程度^[36]
Fig.7 Sensitisation of MYU-3L bladder cancer cells to low doses of UVA^[36]

4.3 长波紫外光辅助硫胸苷治疗方法介绍

自 2001 年以来,英国的 Karran 和徐耀忠进行了大量的研究并发现含 4-硫脱氧胸苷与近紫外光(UVA)协同作用能够选择性地破坏癌细胞的 DNA,并杀死癌细胞及其组织,为此提出一种新颖的癌症治疗方法——紫外光辅助硫胸苷(UVA/4-thiothymidine)治疗方法,即近紫外光与 4-硫脱氧胸苷协同作用,利用快速增殖的癌细胞相对于正常细胞,具有高含量、高活性的胸苷激酶(thymidine kinase,TK),选择性地破坏癌细胞的 DNA 及细胞,达到靶向杀死癌细胞目的。其依据的技术原理是光化学疗法(如图 8 所示)^[54],包含小分子(光敏剂)利用细胞分裂的过程,并入分裂细胞的 DNA 中,降低该细胞分裂的子细胞对激发光的感光系数,通过某一与光敏剂的光学特性匹配的波长(紫外、可见或近红外)的连续光照,使它们敏感致死。4-硫脱氧胸苷作为 UVA 的光敏剂,在胸苷激酶的催化下,能够选择性的进入癌细胞中,在 UVA 的辅助照射下,引起癌细胞的死亡。其介于细胞毒类药物和分子靶向类药物的一种新型抗癌药物——细胞毒类靶向抗癌药物,有更高的选择性和特异性,这是第一次阐述的细胞毒类靶向类抗癌药物,对今后新抗癌药物的研究有重要意义。

4.4 近紫外光辅助 4-硫脱氧胸苷治疗方法与光动

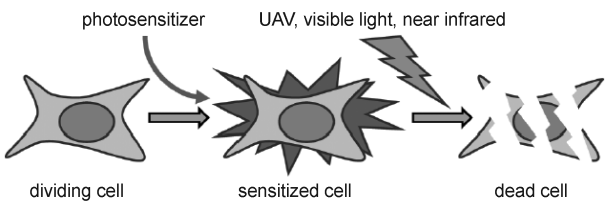


图 8 光化学反应^[54]
Fig.8 Photochemical reaction^[54]

力疗法比较

我们把近紫外光辅助硫胸苷治疗方法(如图 9 上)与现在临床上使用的“光-卟啉类药物”(如图 9 下)治疗肿瘤方法既光动力疗法(PDT)进行比较,发现光动力疗法和近紫外光/4-硫脱氧胸苷疗法相同之处在于都使用光辐射(可见光、近红外光或紫外光)在“光敏药物”的协助下杀死癌细胞。不同之处是光动力疗法在光敏化剂在光源照射下,发生光氧化反应生成大量的单态氧,单态氧与生物大分子(包括蛋白质)中的氧化敏感基团作用导致其氧化失活,最终引起细胞(癌细胞和正常细胞)的死亡^[55~57]。虽然补骨脂素紫外线疗法^[58]通过补骨脂素与 DNA 绑定,在近紫外照射下引起 DNA 的链间交联阻滞 DNA 的复制、转录,同时这类化合物在接受紫外照射时也会产生一定的单态氧。而近紫外光/4-硫脱氧胸苷疗法就是利用 4-硫胸苷,在胸苷激酶的催化下,可以选择性地进入癌症组织细胞,同时以核苷酸的形式并入到细胞的 DNA 中,在低剂量近紫外光照射下,使癌细胞的 DNA 受损,不能够继续复制,实现靶向杀死癌细胞的目的。最近研究证实对掺入 4-硫脱氧胸苷 DNA,近紫外线辐射下不产生杀伤力很大活性氧^[36],而是通过自身结构的变化直接造成 DNA 断裂,形成小片段的寡核苷酸链与蛋白质形成交联^[59,60]。综上所述,近紫外光/4-硫脱氧胸苷疗法比光动力疗法对肿瘤细胞将有更高的选择性和专一性,靶向作用于癌细胞,比光动力疗法具有更好的优势。因此我们认为近紫外光/4-硫脱氧胸苷疗法比光动力疗法有更小的毒性和更小的副作用。

5 近紫外辅助 4-硫脱氧胸苷抗肿瘤机制研究

5.1 4-硫脱氧胸苷进入细胞的途径

胸苷及其类似物,在细胞内细胞可以通过胸苷酸合成酶的作用自身合成,满足自身对胸苷及其类似物的需求。也可以通过胸苷激酶补救途径从环境

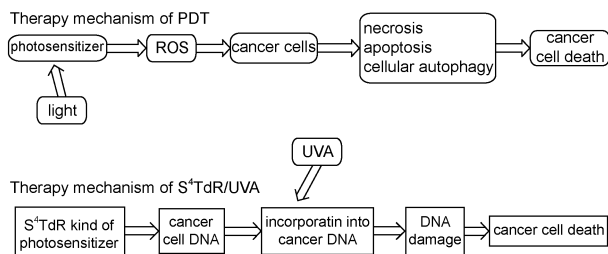


图9 近紫外光辅助4-硫脱氧胸苷治疗方法与光动力疗法比较^[55~57,59,60]

Fig. 9 A comparison Between S^4 TdR/UVA and PDT^[55~57,59,60]

中直接被细胞所摄取(如图10所示),在胸苷激酶的作用下,通过DNA的复制并入到DNA链中。所有的增殖细胞都能够表达胸苷激酶,在4-硫脱氧胸苷嵌入到培养细胞的DNA的过程中,胸苷激酶起着举足轻重的作用^[19,54],也正是由于胸苷激酶在正常细胞与癌细胞中作用强度不同,造成了4-硫脱氧胸苷在肿瘤细胞中对TdR(脱氧胸苷)的取代程度是正常细胞(0.1%~2%)的3~10倍^[19,36,61,62]。而4-硫脱氧胸苷嵌入培养细胞DNA中的程度与其被细胞的吸收程度有关,因此可以通过胸苷合成酶抑制剂如雷替曲塞(Tomudex),一种目前用于晚期大肠癌和乳腺癌治疗的药物^[63],抑制细胞内的胸苷合成途径,增加细胞对环境中胸苷的依赖度^[54],促进细胞对环境中4-硫脱氧胸苷的摄取量,增大其在细胞内的取代度。在对膀胱癌细胞的实验中发现,添加雷替曲塞后其在DNA中的并入程度提高了3~10倍^[36],这表明4-硫脱氧胸苷能够通过胸苷的补救途径被细胞所摄取,在胸苷激酶的作用下高效率地并入到细胞DNA。

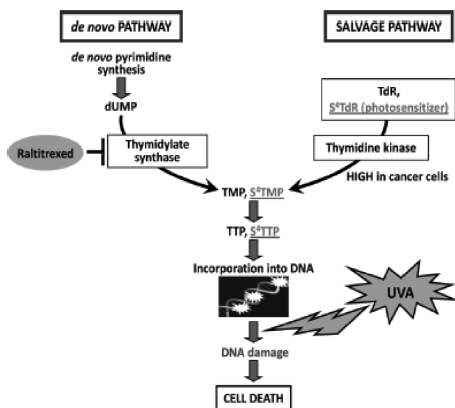


图10 4-硫脱氧胸苷的代谢可以通过胸苷补救途径并入细胞DNA^[54]

Fig. 10 Metabolism of 4-thiothymidine (S^4 TdR) is incorporated into DNA via the salvage pathway^[54]

5.2 近紫外光辅助4-硫脱氧胸苷杀死肿瘤细胞的原理

对于近紫外光/4-硫脱氧胸苷疗法的作用机制还有待研究,但基本认为,由于4-硫脱氧胸苷在结构上与胸苷高度相似,能够与天然胸苷一样,在细胞DNA复制合成的时嵌入细胞DNA链,并专一性地与腺嘌呤配对。为实现这一过程,胸苷及胸苷类似物需要一个特殊步骤:即5位羟基的磷酸化以形成核苷磷酸(TMP)。这一重要步骤需要一种胸苷激酶(thymidine kinase, TK)的催化下进行(如图11所示第一步反应)。为了验证胸苷激酶在近紫外光/4-硫脱氧胸苷疗法对癌细胞的影响(如图12所示),8 KJ/m²的近紫外辐射100 μ M 4-硫脱氧胸苷处理过的Raji细胞(胸苷激酶缺陷型的细胞),与对照组相比,细胞数量都呈现相同显著的增长^[19]。这表明:胸苷激酶是4-硫脱氧胸苷并入细胞DNA的关键酶。

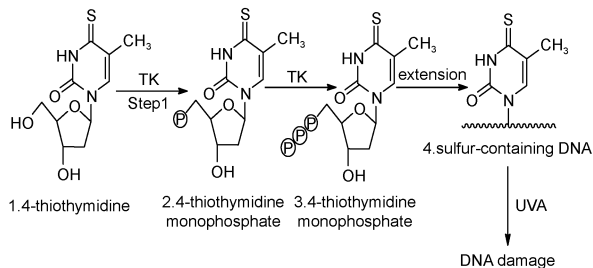


图11 近紫外光辅助4-硫脱氧胸苷杀死肿瘤细胞的原理

Fig. 11 The principle of 4-thiothymidine killing tumor cells by UVA irradiation auxiliary

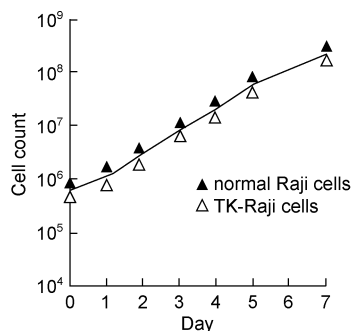


图12 S^4 TdR/UVA对TK酶缺陷型淋巴瘤细胞的毒性^[19]

Fig. 12 The toxicity of S^4 TdR/UVA for TK- Raji cells^[19]

胸苷激酶的活性主要表现在细胞的分裂间期,在S期,这种高活性受细胞分裂影响能够再提高10倍^[54,65]。正常细胞拥有稳定的细胞周期,胸苷激酶表现出较低活性,即使经过4-硫脱氧胸苷处理后,正常细胞DNA对近紫外光仍表现出不敏感;肿瘤细胞具有旺盛的增殖能力,快速增殖的过程中胸苷激酶表现出很高的活性^[66]。这就是4-硫脱氧胸苷能

在低剂量无害的近紫外光辅助照射下,轻易的杀死肿瘤细胞的根本原因^[19]。利用细胞周期检测试验(如图 13 所示)发现,癌细胞中有高达 50% 以上细胞处于 S 期远高于正常细胞 8% ~ 20% 比例,造成近紫外光与 4-硫脱氧胸苷联合作用下,正常细胞的高存活率,而癌细胞的存活率仅为 3% ~ 20%^[54]。由此可见,胸苷激酶在近紫外光/4-硫脱氧胸苷疗法中的靶向性中起着关键作用,从而使治疗表现出低毒、高选择的潜力,其对皮肤癌和其他一些易接触光照部位肿瘤的治疗已受到关注^[36,52]。

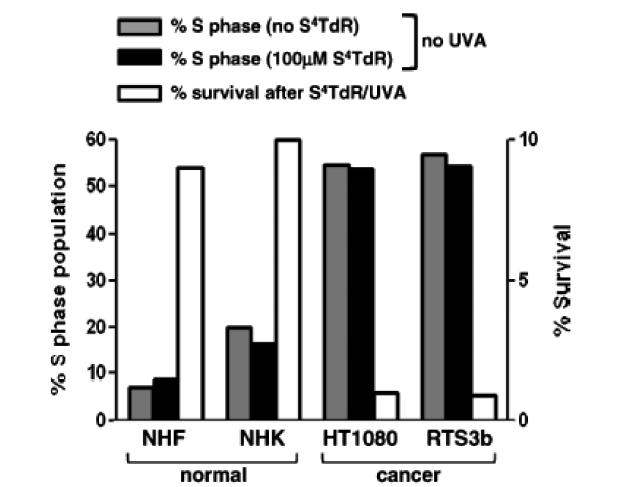


图 13 4-硫脱氧胸苷/近紫外光对不同细胞的协同毒性^[54]

Fig. 13 Synergistic toxicity of S⁴TdR/UVA for different cell type^[54]

5.3 近紫外光辅助 4-硫脱氧胸苷诱发的细胞凋亡

在对人类纤维细胞和自发永角质细胞的实验中,4-硫脱氧胸苷/近紫外光在 24 h 内能够引起的细胞凋亡,透过形态学观察以及在细胞表面检测到相关 Annexin V 蛋白,细胞内也检测出 caspase-3 裂解现象^[53]。对膀胱癌细胞的实验中,4-硫脱氧胸苷/近紫外光作用后的细胞出现了明显的细胞萎缩,对胞内蛋白检测发现 caspase-3 和 caspase-7 两种作为细胞凋亡途径的蛋白的活性均有所增强^[19],这表明 4-硫脱氧胸苷/近紫外光通过诱导细胞凋亡达到杀死肿瘤细胞的目的。对皮肤肿瘤组织活检实验(如图 14 所示)中,4-硫脱氧胸苷涂抹在含有表皮和处于增生肿瘤组织的新鲜癌症患者皮肤组织样品,研究发现在 5 h 内 4-硫脱氧胸苷所能渗透与分布整个表皮厚度。将药物治疗过的组织接受 20 KJ/m² 的近紫外光照射,能够导致细胞的广泛性凋亡,结果表明,病灶内药物浓度和紫外线辐射的强度足以激

活分子,并导致大规模死亡的恶性细胞凋亡(如图 14 A、B 所示),而对正常皮肤活组织切片(如图 14)检查治疗没有明显的影响。其凋亡深度在表皮下延伸了 400 µm,覆盖整个肿瘤组织层面;但这些现象并未在正常的皮肤模型中发现^[67],这也证实之前提到的:近紫外辅助 4-硫脱氧胸苷在引起细胞凋亡的过程中,能够区分肿瘤细胞和正常细胞,而达到靶向治疗的目的^[62,67]。但近紫外光/4-硫脱氧胸苷引起凋亡的具体途径现在还不清楚,有待于进一步的研究。

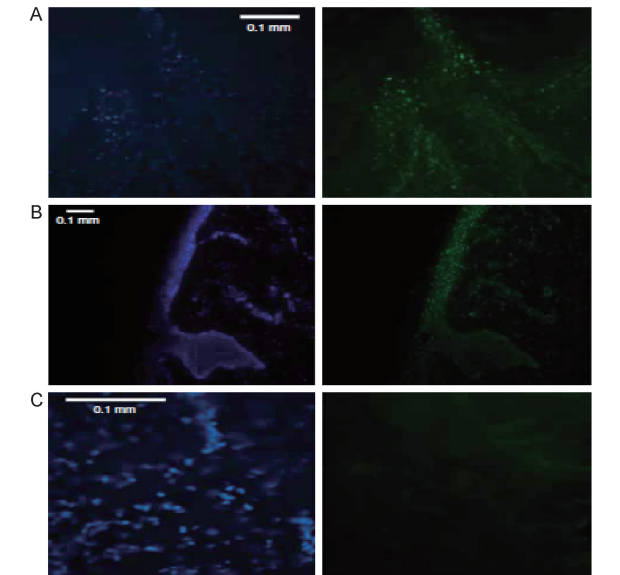


图 14 S⁴TdR/UVA 对恶性皮肤肿瘤的治疗^[67]: A) 基底细胞瘤活组织切片; B) 鳞状细胞瘤活组织切片; C) 正常皮肤组织切片

Fig. 14 4-Thiothymidine + UVA treatment of skin and malignancies^[67]: A) Basal cell carcinoma (BCC) biopsy section; B) Squamous cell carcinoma (SCC) biopsy section; C) Healthy skin section(left, DAPI counterstains; right, TUNEL readings)

5.4 4-硫脱氧胸苷的代谢作用

在 4-硫脱氧胸苷治疗大鼠膀胱癌的动物模型实验中,采用静脉注射或膀胱滴注两种给药方式,让药物单独作用与在近紫外光照射的对比实验中发现:静脉注射与近紫外光联合作用,更能够有效地抑制肿瘤的生长;同时在体内实验中,4-硫脱氧胸苷也表现出明显的靶向性,其并入膀胱肿瘤细胞 DNA 的量是膀胱上皮细胞的 3 倍^[19,36]。对大鼠静脉注射 2 h 后的器官分析发现,4-硫脱氧胸苷均能够并入到几乎所有器官和组织细胞 DNA,其中肝脏和肿瘤细胞的 DNA 并入程度比其他正常组织高出 3 倍,而皮肤和眼睛中的并入程度却比其他正常组织少 10 ~

20 倍。这种在正常组织中的取代作用会在给药后 20 h 显著降低后显著下降(如表 1 所示)。

膀胱癌动物模型实验中,Boddy 等^[36]直接将膀胱癌细胞种植到用稀盐酸预处理的 Fischer 小鼠膀胱中,制成了膀胱癌原位模型。分别以静脉或保留膀胱灌洗的方式进行 4-硫胸苷给药,以确定和对比该疗法在抗肿瘤方面的实际应用疗效,实验分为空白组、静脉注射组、膀胱灌洗、紫外光 UVA 组、静脉注射/UVA 组和膀胱灌洗/UVA 组。实验中在大鼠接受癌细胞接种 5 天后,静脉组按照 160 mg/kg 的剂量进行注射,膀胱灌洗的剂量为 4 mg/ml;药物作

用 20 h 后,接受剂量为 5 KJ/m² 的 UVA 照射,然后进行效果分析发现:观察 15 天后,UVA 单独照射组出现了动物死亡,过静脉注射/UVA 组的肿瘤生长得到了明显的抑制,其抗肿瘤效果远远强于其他实验组。这表明:通过静脉注射便能够进行 4-硫脱氧胸苷肿瘤给药的目的;同时 4-硫脱氧胸苷在各个器官中的代谢时间短,无毒副作用;但由于正常的肝脏、肾脏等增殖能力旺盛的细胞也具有较高的 TK 酶活性,因此会发 S⁴TdR 的异位富集,但在实际应用中,这些部位可以避免接受 UVA 照射,从而也能避免对对正常组织和器官造成影响。

表 1 4-硫脱氧胸苷通过静脉注射(160 mg·kg⁻¹)或膀胱滴注(4 mg/mL 2 h)掺入不同组织 DNA 的程度^[36]

Table 1 S⁴ TdR incorporation into DNA in different tissues following intravenous (160 mg·mg⁻¹) or intravesical (16 mg in 4 mL for 2 h) administration^[36]

route of S ⁴ TdR administration and time point of tissue extraction	amount of S ⁴ TdR incorporated into tissue DNA (% thymidine replaced by S ⁴ TdR (mean ± s. d.)					
	control bladder	bladder tumour	kidney	liver	skin	eye
intravenous S ⁴ TdR						
2 h	undetectable	0.0018 (0.0002)	0.0016 (0.0010)	0.0050 (0.0040)	0.0008 (0.0004)	0.0003 (0.0002)
20 h	0.0055 (0.0002)	0.0140 (0.0006)	0.0040 (0.0030)	0.0200 (0.0100)	0.0005 (0.0004)	undetectable
intravenous S ⁴ TdR						
time 0	0.0010 (0.0008)	0.0040 (0.0100)	0.0014 (0.0007)	0.0049 (0.003)	0.0008 (0.0003)	0.0002 (0.0001)
4 h	0.0010 (0.0005)	0.0028 (0.0010)	0.0005 (0.0003)	0.0062 (0.005)	0.0004 (0.0001)	0.0003 (0.0002)
20 h	undetectable	0.0019 (0.00003)	0.0004 (0.0003)	0.0055 (0.0020)	undetectable	undetectable

6 4-硫脱氧胸苷在血液中稳定性的研究

在构建的大鼠膀胱癌模型实验中,我们发现:4-硫脱氧胸苷通过静脉注射是相对其他给药途径中最好的一种。血清白蛋白(human serum albumin, HSA)是血液循环系统中最丰富的运输蛋白,也是目前研究最早和最多的蛋白之一^[68,69]。血清白蛋白可与许多药物广泛结合,药物与蛋白质的作用机制是描述药物动力学性质的一项重要参数^[70,71]。它可以结合和储运大量的药物,在药物代谢动力学和药效学方面起重要作用。药物分子与血清白蛋白相互作用的研究是介于化学与生命科学之间的交叉学科。从化学研究的角度来看,血清白蛋白与药物结合反应的研究主要包括结合位置、结合数与结合常数、作用力类型、共存物质的影响以及药物在血液中的分配等。研究方法有荧光法、拉曼光谱、平衡透析法、圆二色谱法、紫外光谱法和色谱法等。张晓辉等^[72~74]建立 4-硫脱氧胸苷抗癌药物模型,采用计算

与光谱学实验相结合的方法,与人血清白蛋白(HAS)结合的体外模型,研究了 4-硫脱氧胸苷与 HSA 的相互作用机制,了解二者的结合机理、结合常数、结合部位、结合力、结合距离等问题,对于揭示体内的药物动力学问题、指导合理用药具有一定意义,同时为研究 4-硫脱氧胸苷对 HSA 性能的影响提供一些基础信息,对于进行药物分子设计和新药开发,也具有重要的指导意义。

6.1 光谱法

有些分子与蛋白质等生物分子相互作用后,它们的光谱会有一定改变,因此,光谱法可应用于相互作用分析中。张晓辉等^[72~74]利用紫外光谱、荧光光谱、表面增强拉曼光谱和圆二色光谱等技术研究了生理条件下 HSA 与 4-硫胸腺嘧啶脱氧核苷相互作用,并根据 Stern-Volmer 方程求出 HSA 与 4-硫脱氧胸苷的结合常数及热力学常数,所得的结果与分子模拟所得结果基本吻合,进一步得出了 HSA 与 4-硫脱氧胸苷相互结合间的作用力类型;

并利用表面增强拉曼光谱研究 HSA 与 4-硫脱氧胸苷在不同比例条件下的相结合模式和结合位点；根据圆二色谱考察了 HSA 与药物结合前后的二级结构的变化。此外,张晓辉等^[73]还利用原子显微镜观察研究了药物与 HSA 相互作用前后 HSA 表面形貌的变化。

基于核苷类化合物表现出的抗肿瘤活性及含硫核苷类化合物的光敏性,设计合成了具有光敏特性和较强抗肿瘤活性的 4-硫脱氧胸苷化合物,在对其化合物结构进行 NMR、IR、UV 和 MS 表征后,利用紫外光谱、荧光光谱、表面增强拉曼光谱和圆二色谱等对 4-硫脱氧胸苷与人血清白蛋白 (HSA) 的相互作用进行研究,张晓辉等从紫外光谱实验结果得出 4-硫胸苷与 HSA 的紫外吸收峰明显不同 (图 15 上),下图为差谱,从实验结果可知,依次加入 4-硫脱氧胸苷后 HSA 的紫外吸收峰依次升高,因此,我们可以初步判定,4-硫脱氧胸苷与 HSA 之间主要存在静态猝灭作用^[72]。

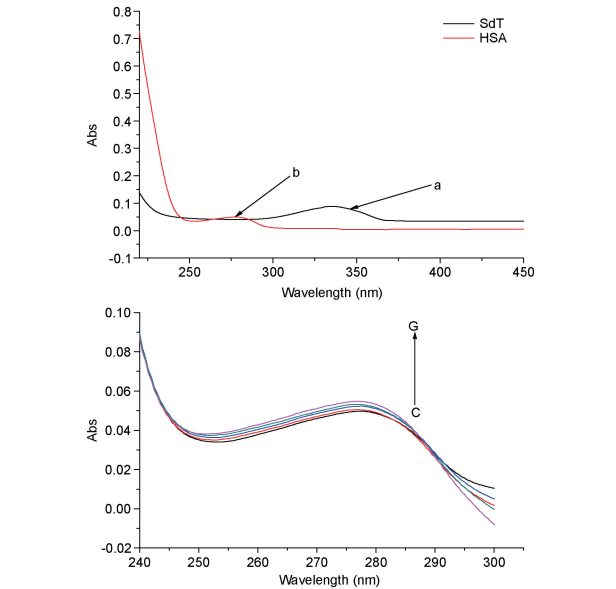


图 15 4-硫脱氧胸苷与 HSA 的紫外吸收光谱图^[72]: 上图 a 曲线代表纯 4-硫胸苷的紫外吸收谱, b 曲线代表 HSA 的紫外吸收光谱

Fig. 15 UV absorbance spectra of HAS and S⁴TdR^[72]: a) UV absorbance spectra of S⁴TdR, b) UV absorbance spectra of HSA

张晓辉等研究了 4-硫脱氧胸苷对人血清白蛋白 (HSA 的) 荧光光谱^[73], 结果 (图 16) 表明 4-硫脱氧胸苷对人血清白蛋白 (HSA) 体系的猝灭是由于形成复合物的静态猝灭, 通过计算得出其结合常数分别为 3.36×10^7 , 3.91×10^7 , 4.31×10^7 L·mol⁻¹。

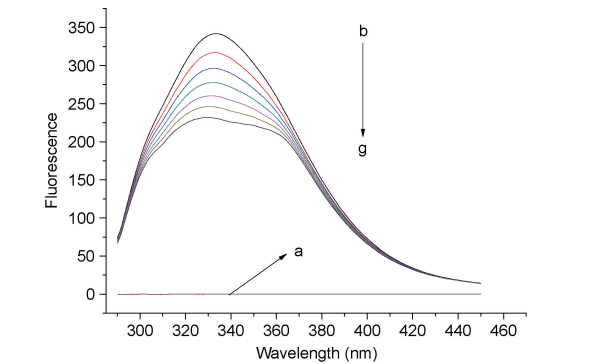


图 16 HSA-4-硫脱氧胸苷体系的荧光光谱^[72]

Fig. 16 Fluorescence spectra of HSA- S⁴TdR^[72]

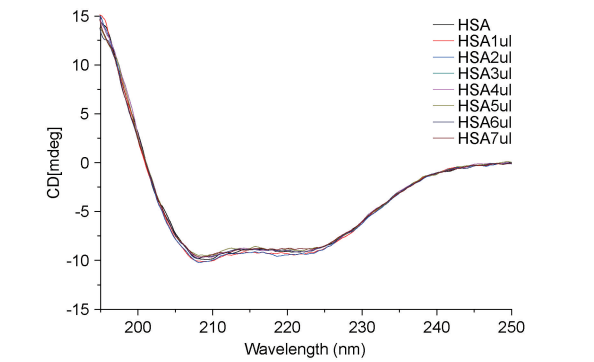


图 17 4-硫脱氧胸苷与 HSA 相互作用的 CD 光谱^[72]

Fig. 17 CD spectra of interactions between HSA and S⁴TdR^[72]

结果表明:4-硫脱氧胸苷与人血清白蛋白之间的主要作用力类型为疏水作用力。另外,圆二色谱 (CD) (图 17) 表明,4-硫脱氧胸苷和 HSA 之间的相互作用不改变蛋白质的二级结构,但会配置至少两个二硫化物桥梁。在 HSA 中与 4-硫脱氧胸苷相互作用移动 HSA 单一的残基 Trp214 (位于亚区域 II A) 从更多的疏水性环境 (在 HSA) 到亲水环境。通过圆二色谱考察 4-硫脱氧胸苷对人血清白蛋白二级结构的影响表明,4-硫脱氧胸苷对人血清白蛋白的二级结构基本没有影响。在用拉曼光谱研究 4-硫脱氧胸苷与人血清白蛋白 (HSA) 的相互作用^[73,74]中,从谱图 18 中可知,除了 DMSO 溶液的拉曼谱峰,4-硫脱氧胸苷 (S⁴TdR) 溶液的表面增强拉曼光谱主要出现在 1146, 1246, 1291 和 1477 cm⁻¹。在 1146 cm⁻¹处 S⁴TdR 溶液表现出了很强表明增强拉曼谱峰,此峰归属于 C=S 的振动。此谱带在 S⁴TdR-HSA 比例为 1:2 时几乎未增强,但是在 S⁴TdR-HSA 比例为 (1:1, 2:1, 4:1) 时,谱峰强度越来越强。此现象说明了无论 S⁴TdR 溶液浓度多大, S⁴TdR 分子始终垂直于 Au 胶表面。此谱峰与荧光

光谱相一致的谱峰,在荧光光谱图中可知,随着 S^4TdR 溶液的浓度的加入,荧光强度逐渐降低。基于此现象的呈现,可表明 S^4TdR 分子位于在HSA的疏水腔内。因此,这可以间接地说明当 S^4TdR 分子自动与HSA进行结合, S^4TdR 分子总是垂直于HSA中的疏水部位。以上的结果表明 S^4TdR 与HSA是通过两个不同部位相结合,一个部位是HSA中的脂肪酸和另一个是脱脂脂肪酸。这进一步说明了小分子物质与蛋白结构的链接方式多数类似于具有芳香族化合物与HSA结合时通过与HSA中的ⅡA和ⅢA区域相互结合(即Ⅱ和Ⅲ的sudlow部位)^[75,76]。因此, S^4TdR 分子也有可能是通过其中的一个或者两个部位与HSA相互结合。除此之外,白蛋白和脂肪酸的最初的结合部位是位于ⅠB、ⅢA和ⅢB子区域及ⅡA。由于HSA中有脂肪酸的存在,使得 S^4TdR 分子改变了HSA中的结构,进一步说明了在有脱脂脂肪酸存在下的HSA中, S^4TdR 分子与HSA相互结合的最初的部位是在Ⅱ部位,在Ⅱ部位处, S^4TdR 分子可能通过静电作用与酪氨酸残基进行相互结合,并且 S^4TdR 分子是以阴离子形式与HSA进行结合(图18)。 S^4TdR -HSA复合物比例为1:4,2:1和4:1时的SERS与 S^4TdR 溶液在pH值为2.23相似,此现象可表明 S^4TdR 分子位于HSA中Ⅰ部位的疏水腔内,并且 S^4TdR 分子通过氢键和疏水作用力与氨基酸进行相互结合,另外,在ⅠB区域内,脂肪酸的结合区域可能也是 S^4TdR 分子在Ⅰ区域内所要结合部位。因为在ⅠB区域内,脂肪酸的分子结构引起了HSA中的Ⅰ和Ⅱ区域的一系列变化,这两个区域的变化对 S^4TdR 与HSA相互结合有着重要作用。

6.2 原子力显微镜成像观察

原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)是1986年发明的^[77],其十分重要的功能^[78]是可实时测量生理状态生物样品分子间的作用力的动态变化。这对于了解生物分子的结构和物理特性是非常有意义的。

正因如此,为了获得更多的药物与HSA相互作用的信息,张晓辉等利用原子力显微镜的轻敲工作模式观测HSA与药物作用前后的HSA样品表面形貌的变化^[73]。图19a为HSA与药物作用前后的表面形貌变化的对照图。从图19a可以清晰看出,HSA分子均匀的吸附在云母片的表面,通过计算得到HSA分子的平均高度为 5.0 ± 2.84 nm。所得的HSA分子尺寸与之前文献报道相接近^[79]。当HSA

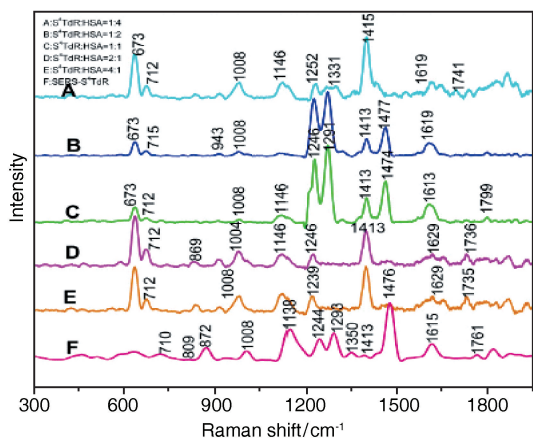


图18 4-硫脱氧胸苷与HSA以不同比例相结合的表面增强拉曼谱图^[73,74]

Fig. 18 S^4TdR and HSA in different proportions with a combination of surface-enhanced Raman spectra^[73,74]

与4-硫脱氧胸苷作用后,HSA分子较之前相比结构大小上变得更大,计算得其分子的平均高度为 15.0 ± 4.5 nm,图19b所示。此外,在云母片表面上还观察到了团聚形状的HSA分子团。蛋白质分子团聚是一种很常见的生物现象,有很多因素可以引起蛋白质分子团聚,如特定的pH值和蛋白质浓度,此外分子间的疏水作用也是引起蛋白质团聚一个重要的因素。HSA与4-硫脱氧胸苷相互作用可能引起了HSA分子微环境改变,分子可能暴露在更加疏水的环境,为了克服这种疏水环境的变化,分子大量聚集在一起,从而减小与水分子接触的面积。由此推测HSA与4-硫脱氧胸苷可能还存在疏水作用力。这与上述荧光光谱实验中的热力学参数分析的结果相符。

6.3 分子对接

分子模拟是指利用计算机建立原子水平的分子模型来模拟分子的结构与行为,进而模拟分子体系的各种物理与化学性质。其理论基础是分子力学、分子动力学和量子力学。将蛋白质与小分子物质的结合部位(肽段)进行人工合成,进而精确研究小分子物质与蛋白质的结合,这是Quagraine等^[80]的美妙设想。利用分子模拟技术可以详细且形象的表示出药物与蛋白质的结合,预测小分子物质与蛋白质复合物的结构及相互作用的亲和性。

一些研究表明,人血清白蛋白在几个结合位点能结合多种配体。从蛋白晶体的三维结构,HSA有三个同源(Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ),如,Ⅰ残基(1-195)Ⅱ残基(196-383)和Ⅲ残基(384-385),每个都有两个子

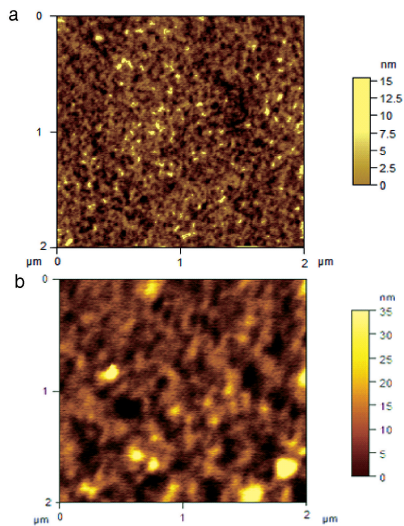


图 19 (a)血清蛋白的原子力显微镜成像; (b) HAS-4-硫脱氧胸苷复合物的原子力显微镜成像^[73]

Fig. 19 (a) The AFM topography image of free HSA (the light dots); (b) The AFM topography image of the HAS-S⁴TdR complex samples^[73]

域, A 和 B 具有共同的结构模式。有人认为, 配体与 HSA 结合的主要区域都位于疏水腔中的子域 II A 和 III A 期, 与 I 和 II 一致, 分别在 HSA 的子域 II A 一个色氨酸残基 (TRP-214)^[81]。有一个大的疏水空腔反映在子域 II A, 许多药物也可以绑定。如图 20 所示: 张晓辉等通过计算机模拟对接程序按最佳能量原理所得的 4-硫脱氧胸苷与 HSA 的对接图^[73], 4-硫脱氧胸苷分子被包围在亚区域 II A 的疏水空腔内, 并且与疏水空腔内的疏水残基比较靠近, 如 Ala(210)、Phe(211)、Gly(207)、Trp(214) 等, 分子对接的结果确认 4-硫脱氧胸苷和 HAS 是由疏水力控制, 这是依照热力学分析结果而提出的键合模型。此外, 有几个氢键在 4-硫脱氧胸苷和 HSA 残留基, 如 Gly(207)、Ala(210) 和 Ser(202) 的结合过程中起着主要的作用。

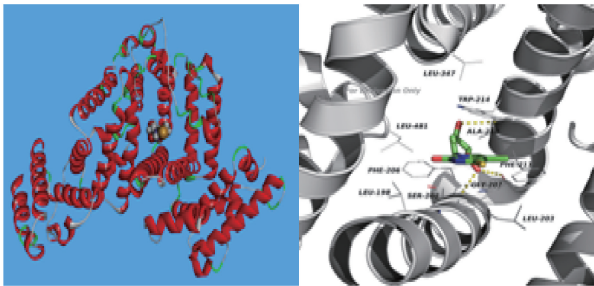


图 20 HAS 与 4-硫脱氧胸苷的分子对接^[73]

Fig. 20 Model Docking of HAS and S⁴TdR^[73]

7 结论

核苷酸作为 DNA 的基本组成单元, 在生命中起着不可估量的作用, 经过化学修饰后的核苷酸类似物具有更加广泛的生物学应用, 在抗肿瘤和抗病毒甚至抗艾滋病的药物研究中占有重要的地位。由于 UVA 的组织穿透能力有限, 目前或许成为制约该疗法的主要屏障, 但 S⁴TdR/UVA 疗法对于皮表、泌尿道、消化道、上呼吸道乃至于距离皮表较近的乳腺、甲状腺等恶性肿瘤都是有效的; 对于肺、脑、肝、肾等 UVA 无法进入的实体器官的恶性肿瘤, 此疗法可能无法发挥有效作用。为解决这一问题, 以 4-硫脱氧胸苷基础, 进行新的结构修饰和取代, 使硫代化合物的吸收波长向可见光区发展, 在临床上配合光导纤维的发展, 意味着今后也可应用在深源性的肿瘤治疗上。目前得到的 4-硫-5-溴脱氧尿苷 (5-bromo-4-thiodeoxyuridine, SBrdU) 和 4-硫-5-碘脱氧尿苷 (5-iodo-4-thiodeoxyuridine, SidU) 等相比较 4-硫胸苷最大吸收波长有了明显的提高^[82]。而以 4-硫胸苷衍生出的新的硫代核苷酸, 作为一种近紫外光敏剂, 其自身不会对细胞产生任何毒性, 能够靶向性的选择癌细胞, 以核苷酸的形式嵌入到细胞 DNA 链中; 却能在近紫外 (UVA) 光的辅助下, 表现对癌细胞的高致死作用, 这可能成为一类在近紫外光辅助下的一种潜在的介于细胞毒类药物和分子靶向类药物的新型抗癌药物——细胞毒类靶向抗癌药物, 对今后新抗癌药物的研究有重要意义。

参考文献

[1] 吴耀文 (Wu Y W), 蒋宇扬 (Jiang Y Y), 付华 (Fu H). 有机化学 (Organic Chemistry), 2003, 23 (10): 1091.

[2] 张迎新 (Zhang Y X), 王洋洋 (Wang Y Y), 冯东 (Feng D). 有机化学 (Organic Chemistry), 2010, 30 (6): 797.

[3] Parker W B, Secrist J A, Waud W R. Curr. Opin. Investig. Drug, 2004, 5(6): 592.

[4] Robak T, Korycka A, Kasznicki M, Smolewski P. Curr. Cancer Drug Targets, 2005, 5(6): 421.

[5] Lipsett M N. Biol. Chem., 1965, 240 (10): 3975.

[6] Xu Y Z, Zheng Q, Swann P F. Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14: 929.

[7] Xu Y Z. Prog. Nat. Sci., 2002, 10: 401.

[8] Xu Y Z. Bioorg. & Med. Chem. Letters, 1998, 8: 1839.

[9] Favre A. Photochemistry and the Nucleic Acids (Ed. Morrison H). New York: Wiley, 1990. 379.

[10] Favre A, Saitomé C, Fourrey J L, Clivio P, Lauga P. Photochem. Photobiol. B, 1998, 42: 109.

[11] Milder S J, Kligler D S. J. Am. Chem. Soc., 1985, 107:

- 7365.
- [12] Nigmn S C, Sahara G S, Shamm H R. *Indian Chem. Soc.*, 1983, 60: 583.
- [13] Lee B H, Shin J H, Lim M K. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 1997, 18 (7): 734.
- [14] Burger K, Mühl B, Kellner M, Rohrmoser M, Gruber-Eber A, Windhager L, Friedel C C, Dölken L, Eick D. *RNA Biol.*, 2013, 10 (10): 1623.
- [15] Nishimura Y, Hirakawa, A Y, Tsuboi M, Nishimura S. *Nature*, 1976, 260 (5547): 173.
- [16] McGregor A, Vaman R M, Duckworth G, Stockley P G, Connolly B A. *Nucleic Acids Res.*, 1996, 24 (16): 3173.
- [17] Nishimura Y, Hirakawa A Y, Tsuboi M. *Nature*, 1987, 5: 217.
- [18] 霍书华 (Huo S H), 李德鹏 (Li D P), 王健 (Wang J), 张晓辉 (Zhang X H). *分子科学学报 (Journal of Molecular Science)*, 2013, 29 (5): 392.
- [19] Massey A, Xu Y Z, Karran P. *Current Biology*, 2001, 11: 1142.
- [20] Reelfs O, Xu Y Z, Massey A, Karran P, Storey A. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2007, 6(9): 2487.
- [21] Cleaver J E, Cortes F, Lutze L H, Morgan W F, Player A N, Mitchell D L. *Mol. Cell Biol.*, 1987, 7, 3353.
- [22] Gemenetzidis E, Shavorskaya O, Xu Y Z, Trigiant G. *J. Dermatol. Treat.*, 2011, 24(3): 209.
- [23] Connolly B A, Nowman P C. *Nucleic Acids Res.*, 1989, 17 (13): 4957.
- [24] Xu Y Z, Zheng Q, Swann P F. *Tetrahedron Letters*, 1991, 32 (24): 2817.
- [25] Xu Y Z, Zhang X H, Wu H C, Massey A, Karran P. *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, 2004, 14: 95.
- [26] Zhang X H, Xu Y Z. *Molecules*, 2011, 16(7): 5655.
- [27] 张晓辉 (Zhang X H), 王爱玲 (Wang A L), 李德鹏 (Li D P), 徐耀忠 (Xu Y Z). *化学进展 (Progress in Chemistry)*, 2010, 22(5): 784.
- [28] Kielbassa C, Epe B. *Methods Enzymol.*, 2000, 319: 436.
- [29] Douki T, Reynaud-Angelin A. Cadet J, Sage E, *Biochem.*, 2003, 42: 9221.
- [30] Cleaver J E, Cortes F, Lutze L H, Morgan W F, Player A N, Mitchell D L. *Mol. Cell Biol.*, 1987, 7: 3353.
- [31] Warren M A, Murray J B, Connolly B A. *J. Mol. Biol.*, 1998, 279: 89.
- [32] Favre A, Saintome C, Fourrey J L, Clivio P, Laugaa P J. *Photochem. Photobiol. B*, 1998, 42: 109.
- [33] Rahn R O, Hosszu J L. *Photochem. Photobiol.*, 1969, 10: 131.
- [34] Clivio P, Fourrey J L, Gasche J, Favre A. *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113: 5481.
- [35] Clivio P, Fourrey J L, Gasche J, Favre A. *Tetrahedron Letters.*, 1992, 33: 1615.
- [36] Pridgeon S W, Heer R, Taylor G A, Newell D R, Toole K O, Robinson M, Xu Y Z, Karran P, Boddy A V. *Br. J. Cancer*, 2011, 104: 1869.
- [37] Perdiz D, Grof P, Mezzina M, Nikaido O, Moustacchi E. *Sage E. Biol. Chem.*, 2000, 275: 26732.
- [38] Rosenstein B S, Mitchell D L. *Radiat. Res.*, 1991, 126: 338.
- [39] Courdavault S, Baudouin C, Charveron M, Canguilhem B, Favier A, Cadet J T. *DNA Repair*, 2005, 4: 836.
- [40] Bartholomew B, Braun B R, Kassavetis G A. *Geiduschek E P. Biol. Chem.*, 1994, 269: 18090.
- [41] Nikiforov T T, Connolly B A. *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20: 1209.
- [42] Reelfs O, MacPherson P, Ren X, Xu Y Z, Karran P, Young A. *Nucleic Acids Res.*, 2011, 39(22): 9620.
- [43] Reardon J T, Sancar A. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006, 103: 4056.
- [44] Nakano T, Katafuchi A, Matsubara M, Terato H, Tsuboi T, Masuda T, Tatsumoto T, Pack S P, Makino K, Croteau D L, Van Houten B, Iijima K, Tauchi H, Ide H. *J. Biol. Chem.*, 2009, 284(40): 27065.
- [45] Ito A, Robb F T, Peak J G, Peak M J. *Photochem. Photobiol.*, 1988, 47: 231.
- [46] Elion G B. *Science*, 1989, 244: 41.
- [47] Weinshilboum R. *Drug. Metab. Dispo.*, 2001, 29: 601.
- [48] Cadet J, Sage E, Douki T. *Mutat. Res.*, 2005, 577: 3.
- [49] Donovan P O, Perrett C, Zhang X, Montaner B, Xu Y Z, Harwood C A, McGregor J M, Walker S L, Hanaoka F, Karran P. *Science*, 2005, 309: 1871.
- [50] Zhang X H, Jeffs G, Ren X L, O' Donovan P, Montaner B, Perrett C M, Karran P, Xu Y Z. *DNA Repair*, 2007, 6(3): 344.
- [51] Swann P F, Waters T R, Moulton D C, Xu Y Z, Zheng Q, Edwards M, Mace R. *Science*, 1996, 273: 1109.
- [52] Reelfs O, Xu Y Z, Massey A, Karran P, Storey A. *Mol. Cancer Ther.*, 2007, 6: 2487.
- [53] Brem R, Li F, Karran P. *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37(6): 1951.
- [54] Reelfs O, Karran P, Young A. *Photochem. & Photobiol. Sciences*, 2012, 11: 148.
- [55] 曾霞波 (Zeng X B), 虞乐华 (Yu L H), 许川山 (Xu C S). *激光杂志 (Laser Journal)*, 2006, 27(6): 91.
- [56] 张晨 (Zhang C), 张励 (Zhang L), 黄世林 (Huang S L). *临床军医杂志 (Clinical Journal of Medical Officer)*, 2011, 39(1): 1.
- [57] 陈文辉 (Cheng W H). 浦宇 (Pu Y). *中国医学文摘皮肤科学 (China Medical Abstracts (Dermatology))*, 2015, 32(2): 109.
- [58] Xia W, Gooden D, Liu L, Zhao S, Soderblom E J, Toone E J, Beyer WF Jr, Walder H, Specto N L, *PloS One.*, 2014, 9(2): e88983.
- [59] Bartholomew B, Braun B R, Kassavetis G A, Geiduschek E P. *J Biol. Chem.*, 1994, 269: 18090.
- [60] Nikiforov T T, Connolly B A. *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20: 1209.
- [61] Courdavault S, Baudouin C, Charveron M, Canguilhem B, Favier A, Cadet J, Douki T. *DNA Repair*, 2005, 4: 836.

[62] Massey A, Xu Y Z, Karran P. DNA Repair, 2002, 1: 275.

[63] Cunningham D, Zalcborg J R, Rath U, Olver I, Cutsem E V, Svensson C, Seitz J F, Harper P, Kerr D, Perez-Manga G. Eur. J. Cancer, 1995, 31A: 1945.

[64] 张晓辉(Zhang X H), 张迎霞(Zhang Y X), 徐耀忠(Xu Y Z). 中国医学工程(China Medical Engineering), 2013, 21(10):192.

[65] Sherley J L, Kelly J T J. Biol. Chem. , 1988, 263: 8350.

[66] Hengstschlager M, Pfeilstocker M, Wawra E. Adv. Exp. Med. Biol. , 1998, 431: 455.

[67] Gemenetzidis E, Shavorskaya O, Xu Y Z, Trigiante G. J, Dermatolog. Treat. , 2013, 24(3): 209.

[68] Yan Y, Xu J G, Chen G Z. Science in China Series B: Chemistry, 1997, 27(1) : 16.

[69] Wu Q H, Wang D Y, Zhou X, Zhang H Z, Liu W H. Spectrosc. Spect. Anal. , 2009, 19(7): 1911.

[70] Liang J, Fen S L. Spectrosc. Spect. Anal. , 2011, 31(4): 1020.

[71] Lin L, Song S Y, Mu X. J. Anal. Sci. , 2007, 23(6): 681.

[72] 银鸿雁(Yin H Y), 郑学仿(Zheng X F), 曹洪玉(Cao H Y), 张晓辉(Zhang X H). 发光学报(Chinese Journal of Luminescence), 2013, 1: 104.

[73] Zhang J L, Gu H M, Zhang X H. Carbohydrate Res. , 2014, 384: 102.

[74] Zhang J L, Gu H M, Zhang X H, Li P F. Acta Laser and Biology Sinica, 2015, 24(1): 98.

[75] 裴明砚(Pei M Y), 郑学仿(Zheng X F), 曹洪玉(Cao H Y). 分析化学(Chinese Journal of Analytical Chemistry), 2010, 38: 948.

[76] Bhattacharya A A, Grüne T, Curry S. J. Mol. Biol. , 2000, 303: 721.

[77] Binnig G, Quate C F, Gerber C. Phys. Rev. Lett. , 1986, 56(9): 930.

[78] Zhu J. Nanoscience & Technology, 2005, 2(3): 42.

[79] Tu A T. New York: John Wiley & Sons Inc. , 1982.

[80] Quagraine E K, Kraatz H B, Reid R S. Inorg. Biochem. , 2001, 85: 23.

[81] Surwicz W K, Mantsch H H, Chapman D. Biochemistry. , 1993, 32: 389.

[82] Brem R, Zhang X H, Xu Y Z, Karran P. Photochem. Photobiol. B, 2015, 145: 1.